Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Heidelberg
(Leiter: Prof. Dr. C. Oehme)

Der Bedarf an d(+) und l(−) Histidin für das Wachstum junger Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruprecht-Karl-Universität zu
Heidelberg

vorgelegt von

Albrecht Ruge
aus Heidelberg

Yale Medical Library

1941
Brausdruck G. m. b. H., Heidelberg

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg.

Dekan: Prof. Dr. Rodenwaldt

Referent: Prof. Dr. Oehme

Bekanntlich unterscheidet man unter den Bausteinen des Eiweißes solche, welche, soweit Experimente an den üblichen kleinen Laboratoriumstieren eine Verallgemeinerung gestatten, der Organismus des Warmblüters selbst bilden kann, von anderen, die mit der Nahrung zugeführt werden müssen, wenn Störungen ausbleiben sollen. Die ersteren werden als entbehrliche, die letzteren als unentbehrlich bezeichnet. Als Kriterium dient das Wachstum, meist dasjenige junger Ratten. Fehlt einer in jeder Hinsicht vollwertigen Nahrung nur eine bestimmte Aminosäure der zweiten Gruppe, so bleibt das Wachstum stehen und kommt erst nach Zulage derselben wieder in Gang. Es ist zu fordern, daß das Wachstum alsdann mit der normalen Geschwindigkeit und dauerhaft, wie bei gemischter, alle notwendigen Komponenten enthaltender Kost vor sich gehe.

Zu den Aminosäuren, deren Fehlen der wachsende Tierkörper nicht entbehren kann, gehören besonders manche cyklischen Verbindungen, wie l(—)Tryptophan und l(—)Histidin, außerdem l(+)Valin, l(—)Leucin, l(—)Threonin, l(+)Lysin, l(—)Methionin.

Oehme (1) hat gezeigt, daß regelmäßige tägliche Verfütterung einzelner Aminosäuren an erwachsene Tiere unter bestimmten Ernährungsbedingungen nach einiger Zeit Wirkungen auf den Grundumsatz oder Hungerstoffwechsel, z. T. unter diesen Umständen auch auf den Stickstoffumsatz ausübt. l(—)Tryptophan, l(+)Valin, l(—) und d(+)Histidin erhöhen den Grundumsatz bei einer Nahrung, die an sich von den betreffenden zugelegten Aminosäuren praktisch frei ist. Die kleinste zu dieser Wirkung nötige Tagesmenge ist größer als bei histidinhaltigem Futter. Der unnatürliche optische Antipode des l(+)Valins, die d(—)Form, erniedrigt den Grundumsatz (2). Auf die Wirkungen der anderen Aminosäuren braucht an dieser Stelle nicht eingegangen zu werden. Wesentlich ist vielmehr hier, daß bei l(—)Tryptophan, wie beim l(+)Valin die Tagesdosis je 100 g Tier, welche erforderlich ist, um einen allmählichen Anstieg des Grundumsatzes zu erzielen, der Größenordnung nach derjenigen sehr nahe liegt, welche eine junge, 50—100 g schwere Ratte zum normalen Wachstum benötigt. Sie liegt für l(—)Tryptophan (1) um 10—20 mg, für l(+)Valin (2) um etwa 15—20 mg. Es war nun von Interesse zu sehen, ob sich auch beim Histidin eine solche Beziehung auffinden läßt.

Die Wirkung des Histidin auf das Wachstum junger Ratten wurde schon von Berg u. Potgieter (3) untersucht. Die für uns wichtige Frage der kleinsten optimalen für das Wachstum notwendigen Menge geht aber aus dieser Arbeit nicht hervor. Es stellt sich also die Aufgabe, diese Dosis möglichst genau zu ermitteln, und zwar für beide optische Antipoden des Histidins.

Bei Cox u. Berg (4) findet man eine Zusammenstellung der schon auf ihren wachstumsfördernden Nutzen untersuchten Stereoisomeren anderer Aminosäuren. So fanden Berg u. Potgieter (3), daß d,l Tryptophan und du Vigneaud, Sealock u. van Etton (5), Berg (6), daß d(+)Tryptophan ebenso wirksam wie die natürliche l(—)Form ist. Das i—Cystin, das von Lawrie (7) und das Mesocystin, das von Loring, Dorfmann u. du Vigneaud (8) untersucht wurde, fördern das Wachstum nur um die Hälfte, wie l(—)Cystin, die rechtsdrehenden Isomeren des Cystins sind nach du Vigneaud, Dorfmann u. Loring (9) gänzlich unwirksam. Entgegen den Verschiedenheiten der optisch aktiven Formen des Cystins, stimuliert nicht nur das natürlich erscheinende l(—)Methionin, sondern auch dessen d(+) und d,l Form das Wachstum, wenn man sie als Zusatz bei cystinfreien Diäten gibt. Das d,l Lysin hat annähernd die Hälfte des wachstumsfördernden Vermögens des l(+)Lysins in lysinfreier Kost.

Erstmalig wurden d(+) und l(—)Histidin von Cox u. Berg (4) untersucht. Dort hat sich erwiesen, daß das Wachstum der Ratten durch d(+)Histidin gefördert wird, wenn es als Zusatz zu histidinarmer Nahrung gegeben wird. Es sei aber offensichtlich in dieser Zusammenstellung weniger wirksam als die natürliche l(—)Form.

Auch auf andere Stoffwechselvorgänge als das Wachstum sind die Antipoden des Histidins von unterschiedlicher Wirksamkeit. Vor einer Reihe von Jahren wurde bekannt, daß l(—)Histidin wirklich abgebaut wird. Abderhalden u. Weil (10) fütterten Kaninchen d,l Histidin. Ein Großteil der Rechtskomponente wurde im Urin wiederentdeckt. Kiyokawa (11) gibt ähnliche Resultate an, indem er d,l Histidin injizierte. Konishi (12) beobachtete, daß d,lHistidin beim Hund nur ein Drittel soviel Urocaninsäure erzeugt, als dies bei l(—)Histidin der Fall ist, und daß d(+)Histidin keine erzeugt. Kiyokawa (11) isolierte Urocaninsäure aus Kaninchenharn nach l(—)Histidingaben, konnte dies aber nicht nach Gaben von d,l Histidin. Nach Edlbacher u. Kraus (13) baut das Leberenzym Histidase d,l Histidin nur halb so schnell ab, als die natürliche Form, wobei Glutaminsäure, Ameisensäure und Amoniak entstehen.

In Hinsicht auf das Wachstum bringt die Arbeit von Conrad u. Berg (14) den experimentellen Beweis, daß d(+)Histidin in der Kost im Körper wachsender Ratten in l(—)Histidin übergeht. Sie verifizieren damit die schon von Berg u. Potgieter (3) aufgestellte Behauptung, daß Wachstumsförderung durch die unnatürlichen Antipoden der Aminosäuren deshalb möglich ist, weil sie im Stoffwechselprozeß in die natürliche Form umgewandelt werden. Conrad u. Berg (14) verfütterten d(+)Histidin an wachsende Ratten und fanden im Gesamttier 58—111 % mehr l(—)Histidin, als aus der Nahrung stammen konnte. Das isolierte Histidin war reines l(—)Histidin.

Die vorliegende Arbeit erscheint in Hinsicht auf die bisher vorliegende Arbeit von Cox u. Berg (14) notwendig, da bei jenen Autoren Zweifel über die vollständig gleiche, wachstumsfördernde Wirkung von d(+) und l(—)Histidin entstanden. Aus ihren abgebildeten Kurven und Tabellen[1] ziehen sie den Schluß, daß „anscheinend" die d(+)Form etwas weniger wirksam ist, als die l(—) Form. Sie stützen sich in diesem Schluß besonders auf die errechneten Efficiency-Quotienten, ein von Palmer u. Kennedy (15) eingeführten Begriff. Diese Zahl bedeutet die verdauliche Trockensubstanz des aufgenommenen Futters in Gramm pro Gramm Gewichtszunahme auf 100 g Körpergewicht für die Dauer des Experimentes. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\text{E.Q.} = \frac{\text{Verdauliche Trockensubstanz}}{\frac{\text{Gewichtszunahme}}{\text{mittleres Körpergewicht}}} \times 100$$

Cox u. Berg (4) gaben für eine Ergänzung von histidinfreier Diät durch 0,125 % l(—) resp. d(+)Histidin einen E.Q. von 8,8 und 9,1 gegenüber 8,5 und 8,1 bei den gleichen Tieren an.

Ratte Nr.	l(—)	d(+)
258	8,80	8,54
255	9,10	8,17
257	5,03	8,81
254	5,21	16,76

Die nebeneinanderstehenden Zahlen stammen vom selben Tier in zwei aufeinanderfolgenden Versuchsperioden.

Dabei bedeutet sinngemäß ein niedirger E.Q. die bessere Wachstumsförderung. Der auffällige Unterschied bei den Tieren 257 u. 254

[1] ibd. S. 499 u. 500.

erklärt sich beim Blick auf die zugehörige Wachstumskurve dadurch, daß zu Beginn der Histidinperioden ein Gewichtssturz erfolgt, wodurch die in die Formel des E.Q. eingehende Gewichtszunahme erheblich gedrückt wird. Nach dem Gewichtssturz beginnt aber, wie aus der Kurve ersichtlich, eine Wachstumszunahme, die sich von der durch l(—)Histidin hervorgerufenen gar nicht unterscheidet. Man kann also die Unterlegung des E.Q. als ein Maß der Wachstumsförderung nur dann gelten lassen, wenn die Kurven einigermaßen gleichmäßig und störungsfrei verlaufen.

Wie unten gezeigt wird, sind die von mir erhaltenen Wachstumskurven für d(+) und l(—)Histidin so übereinstimmend und gleichmäßig, daß überhaupt kein Unterschied für die Wirkung der beiden Antipoden daraus ersichtlich ist.

Von entscheidender Bedeutung für den Versuch ist natürlich vor allem die Dosis der zugeführten Aminosäuren. Stichhaltige Vergleiche können nur bei Anwendung der kleinsten optimalen Dosis gemacht werden. Bei Cox u. Berg (4) wird als solche 0,125 % des Futters angenommen. Dies ist in mg umgerechnet 5,75 mg Histidinmonohydrochlorid, viel weniger, als die kleinste optimale Dosis, die ich für d(+) und l(—)Histidin fand.

Die Absolutwerte des E.Q. von Cox u. Berg (4) sind mit meinem E.Q. nicht zu vergleichen, da aus unbekannten Gründen die Futteraufnahme der Ratten bei diesen Autoren eine geringere ist.

Methodik:

Zu den Versuchen dienten ca. 50 g schwere, männliche, junge Ratten. Sie erhielten eine histidinfreie Kost folgender Zusammensetzung:

Histidinfreies Kaseinhydrolysat	23,0 %
Ziegenfett	10,0 %
Kartoffelstärke	55,0 %
Salzgemisch	4,5 %
Lebertran	5,0 %
Agar	2,0 %
Tryptophan	0,2 %
Cystin	0,3 %
Vitamin B_1 25 γ pro Tier und Tag	
Vitamin B_2 25 γ pro Tier und Tag	
Vitamin C 2 mg pro Tier und Tag	
Vitamin B_2 Komplex[2] = 5 ccm verd. ad 20 ccm, 2mal pro Woche 0,4 ccm.	

[2] Präparat der I. G. Farben.

Das histidinfreie Kaseinhydrolysat wurde nach der Vorschrift von Conrad u. Berg (16) hergestellt. Es enthält nach der Knoopschen Bromwasserreaktion nur Spuren von Histidin (Dr. Bahner). Die Kost wurde in abgewogenen Mengen täglich vorgesetzt und das Nichtgefressene am folgenden Tage zurückgewogen. Wasser wurde in beliebiger Menge gegeben.

Die Tiere wurden zunächst über eine Woche auf dieser Kost gehalten, wobei regelmäßig Wachstumsstillstand eintrat. Neben der täglichen Bestimmung der Futtermenge, wurden die Tiere jeden dritten Tag gewogen. Falls das Tiergewicht über drei Wägungen konstant war, wurde d(+) und l(—)Histidinmonohydrochlorid in verschiedener Menge mit der Schlundsonde, in Wasser gelöst, einmal am Tage zugegeben. Verwendet wurde

l(—)Histidinmonohydrochlorid ($a\frac{20^0}{D} = -39{,}1^0$, N = 19,73%) und

d(+)Histidinmonohydrochlorid ($a\frac{20^0}{D} = +39{,}9^0$, N = 19,89%), das

nach der Vorschrift von Duschinski (17) und Pyman (18) aus aus l(—)Histidin von Herrn Dr. Bahner dargestellt und mir freundlicherweise überlassen wurde. Das Monohydrochlorid wurde in einer kleinen Menge Wasser gelöst und mit der berechneten $NaHCO_3$ neutralisiert.

Untersucht wurden:

3 Tiere mit täglich 5 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid

3 Tiere mit täglich 10 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid

2 Tiere mit täglich 20 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid

2 Tiere mit täglich 5 mg d(+)Histidinmonohydrochlorid

2 Tiere mit täglich 8 mg d(+)Histidinmonohydrochlorid

2 Tiere mit täglich 10 mg d(+)Histidinmonohydrochlorid

Da die Trockensubstanz meines Futters 80 % ist, glaube ich mich berechtigt, als verdauliche Trockensubstanz meines Futters 75 % in die Formel des Efficiency-Quotienten einsetzen zu können. Auffällig ist, daß, wie aus der Tabelle ersichtlich, die tägliche Futteraufnahme abnimmt, je mehr l(—)Histidin die Tiere bekommen, bei d(+)Histidin ist dies nicht so deutlich.

Ergebnisse:

Ratte Nr.	Anfangs-Gewicht	Endgew.	Nach Tagen	Durchschn. tgl. Gew.-Zunahme	Durchschn. tägl. Futterm. pro 100 g Tier	E. Q.
Bei 5 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid:						
17	63	85	24	0,91	15,91	9,68
26	53	83	33	0,92	18,21	10,21
27	54	82	33	0,85	18,41	11,36
Bei 10 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid:						
15	57	114	24	2,37	14,28	3,83
24	51	114	27	2,33	14,37	3,79
25	54	117	24	2,63	14,23	3,46
Bei 20 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid:						
22	52	118	27	2,44	12,22	3,33
23	51	117	27	2,44	12,30	3,18
Bei 5 mg d(+)Histidinmonohydrochlorid:						
28	53	68	15	1,00	15,00	6,75
29	55	70	15	1,00	14,10	6,56
Bei 8 mg d(+)Histidinmonohydrochlorid:						
28	68	90	15	1,47	16,62	5,27
29	70	97	15	1,80	16,60	5,76
Bei 10 mg d(+)Histidinmonohydrochlorid:						
30	51	109	24	2,42	15,00	3,72
31	55	111	24	2,35	14,17	3,91

Die nachfolgenden Kurven zeigen, daß 10 mg und 20 mg l(—) Histidinmonohydrochlorid pro 100 g Tier gleich wachstumsfördernd sind, während 5 mg nur ungefähr die halbe Wirksamkeit auf das Wachstum hat.

Durchschnittliche Gewichtszunahme an einem Tage:

5 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid 0,89 g
10 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid 2,44 g
20 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid 2,44 g

Als kleinste, optimal wachstumsfördernde Dosis wurde somit 10 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid, entsprechend 7,4 mg l(—) Histidin gefunden.

d(+)Histidinmonohydrochlorid wirkt in gleicher Dosis ebenso wie l(—)Histidinmonohydrochlorid.

Durchschnittliche Gewichtszunahme an einem Tage:

5 mg d(+)Histidinmonohydrochlorid 1,00 g
8 mg d(+)Histidinmonohydrochlorid 1,64 g
10 mg d(+)Histidinmonohydrochlorid 2,38 g

Da 5 mg und 10 mg d(+)Histidinmonohydrochlorid annährend die gleiche Gewichtszunahme wie 5 mg und 10 mg l(—)Histidinmonohydrochlorid aufweisen, kann man annehmen, daß auch bei d(+)Histidin die kleinste, optimal wachstumsfördernde Dosis bei 7,4 mg d(+)Histidin liegt.

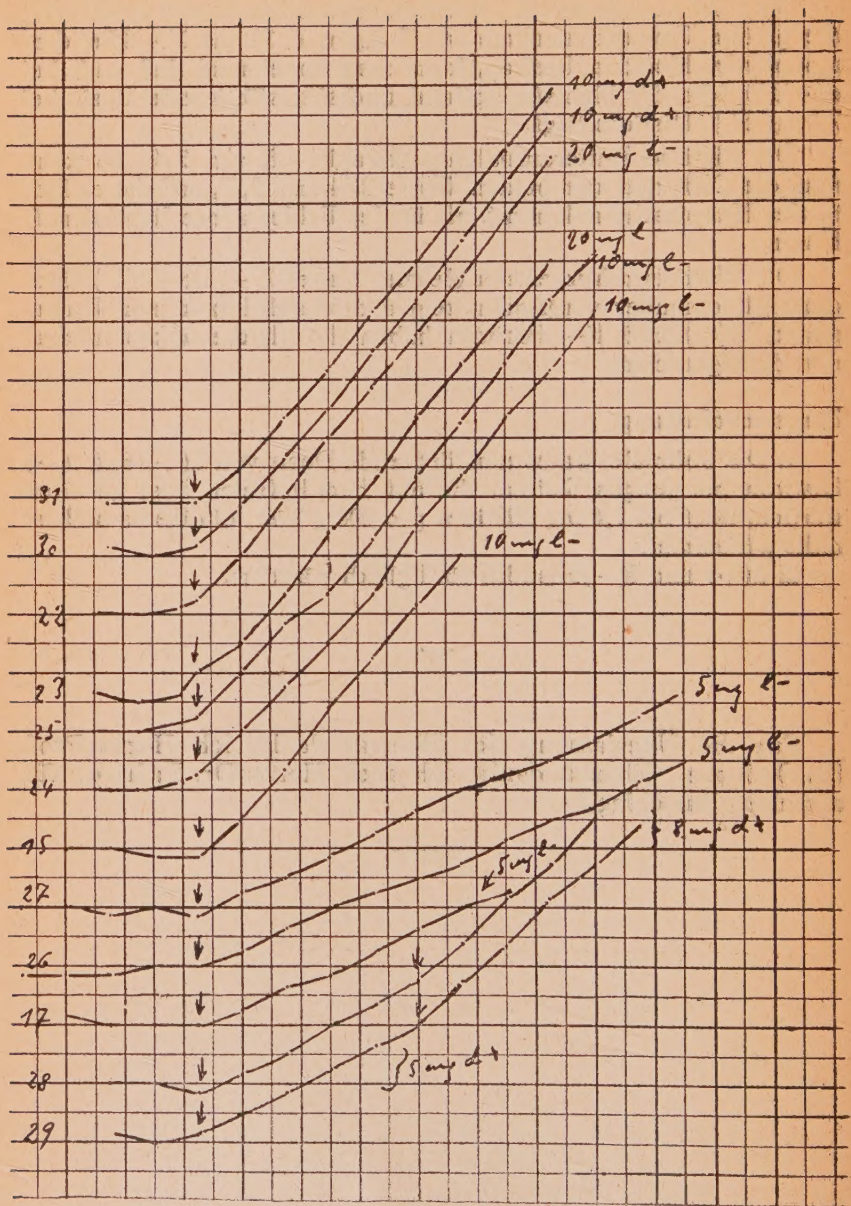
Die tägliche Futteraufnahme schwankt oft um 3%, so kann man die Differenz der beiden Werte 2,44 und 2,38, auf die es hier in der Hauptsache ankommt, als in der Fehlergrenze liegend auffassen.

Die Wachstumskurven der gleichen Gaben l(—) und d(+)Histidins mit einander verglichen, zeigen offensichtlich keinen Unterschied. d(+) und l(—)Histidin haben die gleiche wachstumsfördernde Eigenschaft.

Zusammenfassung:

1. Die optimale, wachstumsfördernde Dosis von d(+) und l(—) Histidin bei jungen Ratten, die auf histidinfreier Kost gehalten werden, liegt bei 7,4 mg Histidin pro 100 g Tier, ein Überschuß ist nicht wirksamer.
2. d(+) und l(—)Histidin sind gleich wirksam.

Für die Überlassung des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. Oehme. Ebenso danke ich auch Herrn Dr. Bahner für manchen Ratschlag.


10 mg d+
10 mg d+
20 mg l-
20 mg l-
10 mg l-
10 mg l-
10 mg l-
5 mg l-
5 mg l-
5 mg l-
5 mg d+
8 mg d+
31
30
22
23
25
24
15
27
26
17
28
29

Literatur.

1. Oehme: Biochem. Z., 302, 12 (1939).
2. Bentz und Oehme: Biochem. Z., 303, 81 (1939).
3. Berg und Potgieter: J. Biol. Chem., 94, 661 (1931/32).
4. Cox und Berg: J. Biol. Chem., 107, 497 (1934).
5. du Vigneaud, Sealock, van Etton: J. Biol. Chem., 98, 565 (1932).
6. Berg: J. Biol. Chem., 104, 373 (1934).
7. Lawrie: Biochem. J., 26, 435 (1912).
8. Loring, Dorfmann, du Vigneaud: J. Biol. Chem., 103, 399 (1933).
9. du Vigneaud, Dorfmann, Loring: J. Biol. Chem., 98, 577 (1932).
10. Abderhalden und Weil: Z. physiol. Chem., 77, 435 (1912).
11. Kiyokawa: Z. physiol. Chem., 214, 38 (1937).
12. Konishi: Z. physiol. Chem., 193, 189 (1925).
13. Edlbacher und Kraus: Z. physiol. Chem., 191, 225 (1930).
14. Conrad und Berg: J. Biol. Chem., 117, 351 (1937).
15. Palmer und Kennedy: J. Biol. Chem., 90, 545 (1931).
16. Conrad und Berg: J. of Nutr., 19, 38 (1937).
17. Duschinski: Festschrift Barell.
18. Pyman: J. Chem. Soc., 99, 1386 (1911).

Lebenslauf.

Am 13. Januar 1913 wurde ich als Sohn des Professors Dr. Arnold Ruge in Heidelberg geboren. Daselbst besuchte ich die Volksschule, hierauf das Realgymnasium in München, Langenargen am Bodensee, Karlsruhe und absolvierte 1934 an der Oberrealschule in Heidelberg. Dann studierte ich Medizin in Heidelberg und Kiel, bestand 1936 in Heidelberg das Physikum und legte, nachdem ich noch ein Semester in Königsberg belegt hatte, 1939 in Heidelberg das Staatsexamen ab. Seit Oktober 1939 bin ich an der Medizinischen Universitäts-Poliklinik in Heidelberg nach Ablauf meines Praktikantenjahres als Volontärassistent tätig.

Albrecht Ruge.